

VU Research Portal

Tail(or)-made Protein Secretion in Pathogenic Mycobacteria

Daleke, M.H.

2012

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Daleke, M. H. (2012). *Tail(or)-made Protein Secretion in Pathogenic Mycobacteria*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

SAMENVATTING

Eiwitsecretie op maat voor pathogene mycobacteriën

Tuberculose is al een oude vijand van de mensheid die nog steeds een belangrijke rol speelt in onze samenleving. Naar schatting draagt een derde van de wereldbevolking de bacterie bij zich die tuberculose veroorzaakt, *Mycobacterium tuberculosis*. Ieder jaar worden wereldwijd ongeveer 9 miljoen nieuwe gevallen gerapporteerd en sterven er 1.5 miljoen mensen aan tuberculose. Hiermee is *M. tuberculosis* de dodelijkste bacteriële pathogeen ter wereld. Na een gestage teruggang in het aantal gevallen van tuberculose in de tweede helft van de 20^{ste} eeuw is tuberculose in de afgelopen decennia weer actueel geworden. Dit is voornamelijk te wijten aan een continue toename in het aantal stammen dat resistent is voor antibiotica en aan de dodelijke combinatie van tuberculose met HIV.

Ondanks het grote belang van deze ziekte is onze kennis over de ziekteverwekker zelf relatief gering. Met name is kennis onvolledig over hoe de tuberculose bacterie het immuunsysteem manipuleert en kan overleven in een gastheer. Wel is onlangs duidelijk geworden dat *M. tuberculosis*, net als andere pathogene (ziekteverwekkende) bacteriën, eiwitten uitscheidt die belangrijk zijn bij het ziekteproces. Deze uitgescheiden eiwitten, zogenaamde virulentiefactoren, spelen een belangrijke rol in het onderdrukken van het immuunsysteem en helpen de bacteriën te overleven en zich te verspreiden. Mycobacteriën zoals *M. tuberculosis* worden omgeven door een complexe celwand die rijk is aan zeer bijzondere vetten (lipiden). Recent is in deze bacteriën een uniek secretiesysteem ontdekt, genaamd type VII secretiesysteem, dat hen in staat stelt om eiwitten uit te scheiden door deze nagenoeg ondoordringbare celwand heen. Dit systeem is in de tuberculosebacterie aanwezig in vijf vormen, ESX-1 tot en met ESX-5. Iedere vorm scheidt een specifieke groep eiwitten (substraten) uit, en lijkt een verschillende rol te spelen in het ziekteproces. In dit proefschrift wordt het moleculaire mechanisme achter het type VII secretiesysteem beschreven. Door het uitvoeren van een gedetailleerde studie naar eiwitten die via dit systeem uitgescheiden worden, zijn we in staat geweest een aantal eigenschappen te bepalen die vereist zijn voor de herkenning en uitscheiding van deze eiwitten. Deze kennis kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe strategieën om *M. tuberculosis* te bestrijden.

Via het ESX-5 secretiesysteem scheidt de tuberculosebacterie een groot aantal PE en PPE eiwitten uit. Deze eiwitten zijn uniek voor mycobacteriën en spelen een belangrijke rol in de ziekteverwekkende capaciteit (virulentie) van deze bacteriën, al weten we nog niet precies hoe. Eiwitten zijn opgebouwd uit aminozuren. De volgorde (sequentie) van de aminozuren bepaalt de functie van het eiwit. PE en PPE eiwitten hebben een karakteristiek geconserveerd N-terminaal domein van respectievelijk 110 en 180 aminozuren, die de PE en PPE domeinen worden genoemd. Deze geconserveerde domeinen hebben mogelijk een zelfde functie. In **hoofdstukken 2 en 3** beschrijven we drie nieuw door ons herkende PE en PPE eiwitten als substraten van ESX-5. Wij laten zien dat de secretie van deze eiwitten afhankelijk is van de PE en PPE domeinen. Ook laten we zien dat het PE domein alle informatie bevat die nodig is voor secretie via het ESX-5 systeem. De functie van het PE en mogelijk ook het PPE domein zou dus de interactie met het secretiesysteem kunnen zijn.

Slechts een klein deel van de eiwitten die door de bacterie aangemaakt worden is bestemd voor secretie. Om deze eiwitten te herkennen worden ze uitgerust met moleculaire secretiesignalen die werken als adreskaartjes. Wij hebben gezocht naar het signaal dat zorgt voor de herkenning van PE en PPE eiwitten door ESX-5. Omdat de resultaten uit hoofdstukken 2 en 3 laten zien dat dit signaal aanwezig moet zijn in de PE (en PPE) domeinen concentreerden we onze analyse (**hoofdstuk 4**) op PE25 en PPE41, twee eiwitten die geheel bestaan uit deze domeinen. Deze kleine eiwitten binden aan elkaar en vormen samen een dimeer eiwitcomplex, waarvan wij hebben laten zien dat dit uitgescheiden wordt door ESX-5. Uit onze studie blijkt dat de secretie van het PE25-PPE41 complex afhankelijk is van een kort secretiesignaal aan het uiteinde van het PE eiwit. Dit signaal heeft geen vaste structuur en is waarschijnlijk een flexibel klein staartje aan het uiteinde van het complex dat herkend wordt door ESX-5. Deze aminozuursequentie komt voor in alle PE eiwitten die via ESX-5 worden uitgescheiden, en blijkt dus een algemeen secretiesignaal voor ESX-5 te zijn. Met name twee aminozuren bleken van groot belang voor de secretie: een tyrosine residu (Y) en, drie aminozuren verder, een negatief geladen aminozuur, aspartaat (D) of glutamaat (E).

Niet alle PE eiwitten gaan naar buiten via ESX-5; de secretie van enkele PE eiwitten is afhankelijk van ESX-1. Wij hebben uitgevonden dat deze eiwitten hetzelfde signaal gebruiken als degenen die door ESX-5 worden uitgescheiden. Tot onze verrassing ontdekten wij bovendien dat het signaal ook een vereiste is voor de secretie van andere virulentiefactoren die via de type VII systemen worden uitgescheiden, namelijk ook de zogenaamde WXG100 eiwitten en de Esp eiwitten. Hieruit blijkt dat de door ons gevonden aminozuursequentie een meer algemeen secretie signaal is voor eiwitten die via het type VII systeem uitgescheiden worden.

Nu we weten dat alle bekende type VII substraten een helix-turn-helix structuur vormen met daarna het secretiesignaal (YxxxD/E), kunnen we deze kennis gebruiken om aan de hand van de genomsequenties nieuwe substraten voor type VII secretie op te sporen. Een tweede stap in het onderzoek dat in **hoofdstuk 4** beschreven staat was dus het zoeken met behulp van de computer naar alle eiwitten van *M. tuberculosis* die dit algemene secretiesignaal bevatten. Op deze manier hebben wij ongeveer 110 eiwitten gevonden die mogelijke substraten van het type VII secretie systeem zijn, waaronder een aantal verwachte eiwitten maar ook een aantal zeer interessante geheel nieuwe kandidaten.

Ten slotte hebben we in **hoofdstuk 4** ook nog aangetoond dat het algemene secretiesignaal noodzakelijk is voor secretie via de type VII systemen, maar niet bepaalt door welk van de verschillende type VII systemen het eiwit wordt getransporteerd. Dit betekent dat er een tweede signaal moet zijn dat de PE en PPE eiwitten naar ESX-1 of ESX-5 sorteert.

In **hoofdstuk 5** zijn we op zoek gegaan naar een signaal dat wel het verschil zou kunnen maken tussen de ESX-1 en ESX-5 secretiesystemen. Hierbij hebben we ons gericht op een relatief onbekend eiwit van deze secretiesystemen, het EspG eiwit, dat zich bevindt in het oplosbare deel van de cel (cytoplasma). Met behulp van bindingsexperimenten hebben we kunnen aantonen dat EspG₁ en EspG₅ eiwitten inderdaad specifiek de PE en PPE eiwitten herkennen en alleen die eiwitten binden die via het eigen systeem uitgescheiden worden. Dat wekt de suggestie dat het



signaal dat bepaalt door welk type VII systeem een PE/PPE eiwit uitgescheiden wordt, tot stand komt door de interactie tussen het eiwit en het EspG eiwit.

Met het werk dat in dit proefschrift is beschreven is deels opgehelderd hoe het type VII secretiesysteem van pathogene mycobacteriën substraten herkent. Met deze kennis zou het nu mogelijk kunnen zijn om de ontdekte signalen te koppelen aan andere eiwitten, ten einde deze eiwitten via een type VII systeem te laten uitscheiden. Deze strategie is interessant voor het ontwikkelen van vaccins. Daarnaast hebben wij een aantal potentiële nieuwe substraten van het type VII secretiesysteem gevonden. Verder onderzoek aan deze eiwitten kan leiden tot nieuwe inzichten in de virulentie van *M. tuberculosis* en de pathogenese van tuberculose.